



TITLE:

Analysis of characteristic differentiation processes at the single cell level(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Chung, Jihye

CITATION:

Chung, Jihye. Analysis of characteristic differentiation processes at the single cell level. 京都大学, 2016, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2016-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19759>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により本文は2019-06-07に公開; 許諾条件により要約は2017-01-15に公開

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	鄭 智蕙
論文題目	Analysis of characteristic differentiation processes at the single cell level （特徴的な細胞分化過程に対するシングルセル解析）		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>細胞の分化は、多能性の幹細胞から様々な特殊化された機能を持つ細胞が形成される過程である。細胞分化制御の異常は、疾病の原因となる場合が多いため、分化に関する研究は、各種疾病についての研究のために非常に重要である。なかでも、がんは細胞分化状態における乱れを特徴として持つ疾病の一つであり、がんの発生と進行状況に応じて細胞の分化状態が変化していくことが知られている。</p> <p>細胞の分化をはじめとする様々な生命現象を研究するために、従来は数十万以上の細胞からなる細胞集団を全体として対象とする、集団解析法が主に用いられていた。しかし、近年の研究により、同一集団内の細胞間でも遺伝子発現様式や生理的挙動にバラつきが存在することが明らかにされ、従来の集団解析では平均化されてしまうため、単一細胞（シングルセル）の性質に焦点を当てた解析を行う必要があると考えられるようになってきた。そこで、本研究では、細胞の神経分化過程及びがんの発生初期段階における細胞集団の不均質性に注目し、細胞集団内における異質な細胞が示す挙動のシングルセルレベルでの解析を試みた。</p> <p>1. 分化阻害剤のダイレクト・インジェクションによる PC12 細胞の神経分化のシングルセル解析</p> <p>細胞分化過程のモデル細胞の中で、PC12 細胞は神経細胞分化の研究で幅広く用いられるラット副腎褐色細胞腫由来の細胞株である。PC12 細胞は、神経成長因子の刺激に応答し、神経細胞のような突起を持った細胞に分化する性質を持っているため、神経系の発生やアルツハイマー病などの疾病研究に有用である。PC12 細胞の神経分化は、特定の低分子化合物により抑制できるということが知られているが、化合物を培地に添加するだけの従来の実験手法では、ターゲット細胞内に実際に導入される分子の正確な量を測定・調節することができないという問題がある。そこで、本研究では、新しく開発した装置を用いる自動マイクロインジェクション法により、個々のターゲット細胞内に直接導入する分化阻害剤の量を正確に調節し、シングルセルにおける神経突起長の変化の経時的な追跡を通じて、分化阻害剤の細胞内導入量と分化抑制効果の間の定量的関係を明らかにした。</p> <p>具体的には、分化阻害剤の一種である U0126 をターゲット細胞内に直接注入することで、既存の培地添加法では不可能であった、一個一個のシングルセルへの導入量を正確に調節することを可能にした。マイクロインジェクション法により、培地添加法で明らかな分化抑制効果を示す最低濃度（一細胞当たりの分子数は 1.2×10^8 分子に相当）の約 1,000 分の 1 となる注入量（一細胞当たり 1.5×10^5 分子）でも、明らかな分化抑制効果が発揮されるということが明らかになった。即ち、分化阻害剤のマイクロインジェクションによって、培地組成を変えずに細胞内に導入する正確な量を調節することが可能になり、その量による分化過程への影響も定量的にシングルセルレベル</p>			

で解析することができた。

さらに、インジェクションのターゲット細胞を蛍光試薬で染色し、開発した装置のタイムラプス機能を用いて長時間のシングルセル追跡を行った結果、PC12の神経分化は、神経突起の伸長と収縮の両方を伴うダイナミックな過程であり、個々の細胞における神経突起長の変化は、同じ処理を行った細胞集団内でも不均質であることを明らかにした。

2. がん抑制遺伝子 *Scribble* 変異細胞と正常細胞の共培養による細胞変化の解析

がんは細胞の分化状態の乱れを特徴として持つ疾病であり、様々な遺伝子変異により引き起こされることが知られている。従来のがん研究では、主に、がん細胞自体が持つ遺伝子変異に焦点が当てられており、周辺の微小環境や正常細胞との相互作用はあまり注目されていなかった。しかし、ショウジョウバエやイヌ由来細胞株を用いた近年の研究で、がんを誘発する遺伝子変異を持つ細胞と正常細胞を共培養すると、どちらかの細胞が細胞層から排除されるという現象が報告され、両者の間で起こる相互作用が注目されるようになってきた。そこで、本研究では、ヒト由来のがん細胞と正常細胞の相互作用における分子メカニズムに関する知見を得ることを目的に、ヒト胎児腎臓細胞株である HEK293T 細胞でがん抑制遺伝子 *Scribble* を完全に欠損させることでがん発生初期細胞のモデル株を作製し、正常細胞との共培養系で起こる変化について調べた。

まず、ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムを用いて、HEK293T 細胞のがん抑制遺伝子 *Scribble* を欠損させた KO#18 株を作製した。ネガティブコントロールとしては、蛍光タンパク質 GFP のみを生産させた D#1 株を用いた。同数の KO#18 細胞または D#1 細胞をそれぞれ正常細胞と共培養させたところ、がん発生初期の細胞のモデルである KO#18 細胞は、D#1 細胞に比べて、速い増殖を示すことが明らかになった。この結果は、*Scribble* の欠損が、正常細胞との共培養において、細胞の増殖に有利な方向に作用することを示唆している。

さらに、集団の中からがん細胞が出現した場合の正常細胞の応答を分子レベルで調べるために、共培養系から分離した正常細胞に対してロングモノリスカラム装着ナノ LC-MS/MS を用いた定性プロテオーム解析を行った。その結果、*Scribble* 欠損 KO#18 細胞と共培養させた正常細胞から 139 種類のタンパク質が特異的に同定され、これらのタンパク質が、集団内のがん細胞出現に対する応答に関与しているものであると考えられた。これらのタンパク質に対して遺伝子オンロジー解析を行った結果、微小管などの細胞骨格に関連するタンパク質が多く含まれていることが判明し、集団内のがん細胞出現に対する正常細胞の応答においては、細胞運動性や物質輸送機能の変化が重要な役割を果たすことが示唆された。

注)論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

細胞の分化過程は多細胞生物の発生と生存に必須の現象であり、分化に関する知見は様々な疾病の研究のためにも非常に重要である。本研究は、シングルセル解析に基づいた研究手法を用いることにより、従来の集団解析法では平均化されてしまうため見る事ができなかった集団内の個々の細胞の挙動の厳密な解析を通じて、細胞の分化メカニズムの解明に新しい視点を与えており、成果として評価すべき点は以下の通りである。

1. 神経成長因子により分化誘導される、神経分化の重要なモデル細胞株である PC12 細胞に対して、分化過程のシングルセル定量解析を行った。分化制御因子を細胞内へ正確に導入するために、新しく開発した自動マイクロインジェクション法を用いた。これにより、従来の手法ではできなかった、個々の細胞内への物質導入量の正確な調節を可能にし、分化への影響をシングルセルレベルで精密かつ定量的に解析した。その結果として、細胞の分化過程が細胞間で極めて不均質であることを明らかにした。
2. 細胞の分化制御に密接な関連を持つがんの発生に関して、がん抑制遺伝子 *Scribble* を完全に欠損させた細胞（初期がん細胞）と正常細胞の共培養系を構築することにより、初期がん段階の細胞集団モデルを再現した。系内の一定領域内にある細胞数を経時的に観察することにより、*Scribble* の欠損が正常細胞との共培養において、増殖に有利な方向に作用することが明らかになった。さらに、定性プロテオーム解析により、*Scribble* 欠損細胞との共培養によって、正常細胞内で細胞骨格関連のタンパク質の変動が生じることを初めて示した。

以上のように、本論文では、自動マイクロインジェクションという新規の技術を適用することで、既存の集団解析法では見る事ができなかった、分化過程における細胞集団内の個々の細胞の挙動を正確に解析することに成功した。さらに、細胞分化に異常が生じる代表的な疾病であるがんに関しても、異質な細胞集団モデルを再現し、集団内のがん細胞の出現に対する正常細胞の応答を明らかにすることにより、細胞分化に関連する新規で興味深い知見を得ている。これらの結果は、生化学、細胞生理学、生体高分子化学の発展に寄与するところが大い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 28 年 2 月 8 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することと支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から 3 ヶ月以内）